использованы в качестве эффективных компонентов сред, однако в каждом конкретном случае необходимо подбирать оптимальные варианты.

**Выводы**

1. Полярность ингредиентов синтетических сред оказывает существенное влияние на криобиологические показатели сохраненных объектов вследствие межмолекулярного взаимодействия их через ионные связи, с элементами цитоплазматических мембран.

2. Способность аминокислот образовывать биокомплексы или препятствовать образованию крупных кристаллов льда повышает эффективность криоконсервации геномов животных.

3. Механизмы криопротекторного эффекта полярных соединений могут реализовываться путем становления межмолекулярных взаимодействий в криобиологических системах.

4. При создание новых криоконсервантов необходимо учитывать их физико-химические свойства и видоспецифичность консервируемого материала.

**SUMMARY**

**In the experiment it was studied the role of substances with different polarity (glucides and amino acids) at the cryopreservation of bull's semen and of cock's semen. It was established the factors which depend on their influence of the gametes of experimental animals. The researchers tried to explain the mechanisms of the cryoprotective activity in a new way. It was summed up that the glucide was well studied monosaharid in the cryopreservation process of bull's semen which has the property to stabilize the intermolecular interactions as in the glycolipids complexes as in those glycoproteinic. At the same time with the increase of the content's monomerycal links the morphophysiologycal indices of deconservated material also increase. The performed experiments established that the cryoconservative result of the substances with the different polarity was able to understand proceeding from the changes of superficial load of the plasmatic membranes of gametes.**

Литература

1. Болдырев А.А. Введение в мембранологию. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
2. Борончук Г.В., Балан И.В. Криомембранология. Кишинев, АНМ, 2003. 336 с.
3. Мельникова О.В., Бондаренко Т.П. Модифицирующее действие глюкозы на чувствительность эритроцитов к температурному и осмотическому стрессу // Физ.-хим. процессы в криобиологических системах. Харьков, 1991. С. 68-78.
4. Милованов В.К. Биология воспроизведения и исскуственное осеменение животных. М.: Изд-во с-х литературы и плакатов, 1962. 696 с.
5. Наук В.А. Структура и функция спермиев с-х животных при криоконсервации. -Кишинев: Штиинца, 1991. 200 с.
6. Фурдуй Ф.И., Чокинэ В.К., Вуду Г.А. и др. Гаметогенез как начальный этап закладки генетических основ здоровья // Известия АНМ, 2002. № 4. С. 30-39.
7. Шерман С.А. и др. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. Минск: Наука и техника, 1989. 239 с.
8. Balan I., Boronciuc Gh. Modificările lipidelor membranice în ciclul congelarea decongelarea spermei animalelor agricole // Luc. şt.: UASM, 2005. Vol.13. P. 215-218.
9. Nicolov I., Nestorova J., Hristov M. et al. Investigation of the semenogram and morphological changes of he-goat spermatozoa during equilibration // Macedonian Joarnal of reproduction, 1996. Vol. 2. № 1. P. 75-78.

УДК: 576/57.086.862+57.086.864+57.086.866

**В.А. Никитин, А.С. Соболев**

*Институт биофизики клетки РАН (ИБК РАН), Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН)*

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И СОМАТИЧЕСКОГО КЛОНИРОВАНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ И ВОСПРОИЗВОДСТВА ИСЧЕЗАЮЩИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

Главная тема настоящих исследований – реконструкция единичной клетки, фундаментальные и технологические аспекты проблемы клонирования. Эти работы находятся в русле научного направления по сохранению исчезающих видов животных, создателем которого в нашей стране был профессор Б.Н. Вепринцев.

Сохранение исчезающих видов животных осуществляется различными метода-

ми. Это, прежде всего, создание заповедников, зоопарков, различных трансгенных технологий, а также развитие селекции и криоконсервации – сохранение генного материала в криобанках. Каждый метод имеет свои преимущества и ограничения, свои уровни возможного применения для решения поставленной задачи. Так, если соматические клетки можно сохранять вне криобанка с помощью периодического пересева культур, гаметы и ранние эмбрионы нельзя использовать снова после того, как они уже однажды были разморожены, так как повторные криогенные воздействия могут их повредить.

Таким образом, в ряде случаев клонирование животных может явиться единственной технологией, с помощью которой можно получить достаточное количество особей с требуемыми качествами.

Клон – это множество клеток или организмов, сохраняющих генотипическую и эпигенотипическую наследственность, что определяет преемственность и сохранение изменений, происходящих в ряде поколений. Единичную клетку нельзя называть клоном.

В настоящее время можно говорить о существовании нескольких типов клонирования:

1. клонирование хирургическим разделением ранних предимплантационных эмбрионов, начиная с 2-х клеточной стадии,

2. клонирование с использованием трансплантации ядер, пронуклеусов или кумулюсных клеток ооцитов из одного эмбриона в предварительно энуклеированный эмбрион,

3. трансплантация ядер репрограммированных соматических клеток в предварительно энуклеированный эмбрион,

4. клонирование с использованием стволовых клеток.

Процент успешного получения предимплантационных эмбрионов и живого потомства животных методами микрохирургии исключительно низкий – всего 0.1-3(%). Кроме того, новорожденные особи в большинстве случаев имеют серьезные аномалии развития [1, 2]: отек плаценты или аномально большую плаценту, большой вес, высокий уровень ранней смертности, наличие опухолей и т. д. В то же время поразительной особенностью работ по клонированию является то, что многие авторы не описывают подробно условия микрооперации и не документируют сообщения фотографическим материалом, а также не обсуждают в качестве возможных причин неудач ошибки при проведении микрохирургии клетки.

Проблема воспроизводимости экспериментов по клонированию, достижения управляемых, не случайных успехов, представляется нам исключительно важной. Подробный анализ экспериментов по клонированию К. Илмензее позволил нам найти возможные причины того, почему автор не смог воспроизвести свои результаты. Это помогло нам получить клонированную мышь методом переноса пронуклеусов в предварительно энуклеированную яйцеклетку раннего эмбриона мыши с использованием метода электрослияния [3]. На ферме в Украине были получены генетически идентичные близнецы телят высокопродуктивной Лебединской породы коров методом микрохирургического разделения бластоцист, как одного из вариантов клонирования [4].

Детальный анализ в серии экспериментов особенностей и трудностей высокотехнологичной методики пересадки ядер позволил нам придти к заключению, что низкий процент успешных экспериментов по клонированию может быть связан, в том числе, с повреждением органелл при их переносе и с серьезными ошибками в процессе проведения микрохирургических операций [5]. Разработан ряд новых методических подходов для ряда стадий микрохирургической операции и создан набор устройств и микроинструментов, минимизирующих повреждение эмбриона [6, 7, 8]. Это позволило увеличить выход жизнеспособных предимплантационных эмбрионов при клонировании в несколько раз по сравнению с известными в литературе данными. Удалось также модифицировать уже существующие сложные устройства и приспособить их для работы в условиях экспедиции. Экспедиции нашего Института успешно работали с некоторыми из этих устройств на Дальнем Востоке, в Украине, а также при выезде с оборудованием в Берлинский Научно-исследовательский Институт Биологии животных Зоопарка и Дикой природы (IZW). Разработанные нами подходы, методы и приборы используются в ряде Институтов РАН и в Харьковском НИИ животноводства (Украина) в работах по генной и клеточной инженерии и по репродуктивному клонированию животных.

В настоящее время интенсивно разрабатывается уникальная технология переноса генома с помощью молекулярных конструкций. Это новое направление да-

ет большие возможности как для работ по генной коррекции, так и по генной терапии млекопитающих, что, в свою очередь, так или иначе может быть связано с сохранением популяций. В работах [9, 10, 11, 12] нам удалось впервые продемонстрировать перенос генов в составе молекулярных конструкций в клетки молочных желез мышей и овец и в эмбрионы мышей и кроликов с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Сохранение исчезающих видов животных с помощью клонирования, в том числе в сочетании с криоконсервацией, имеет большие перспективы. Для этого есть и технологии, и устройства, накоплен также большой опыт экспериментирования при использовании в качестве объектов как лабораторных животных, так и различных сельскохозяйственных животных. Есть также возможности для работы в условиях дикой природы и в зоопарках.

С использованием криобанков сохранение генетического материала путем клонирования и развитие методов репрограммирования для соматического клонирования позволят преодолеть многие проблемы сохранения исчезающих видов животных на нашей Планете с помощью прямого их воспроизведения.

**SUMMARY**

**Embryonic and somatic cloning is one of the methods for endangered animals preservation for it offers the great opportunities for conserving of genetic material outside cryobank and restoration of population in zoo and wildlife animals. Although the main achievements in mammalian cloning are connected with the usage of technology of nuclei transfer, the yield of intact preimplantation embryos and live births is extremely low (0,1-3%), and the new births have serious abnormalities. Basing on our own experiments in cloning we analyse in details the peculiarities and difficulties of several the stages of the technique of nuclear transfer and offer the new methods, new devices and technology approaches.**

Литература

1. Андреева Л.Е., Серова И.А. Повреждающее действие микроманипуляционной техники, применяемой для трансгенеза, на развитие мышей. Онтогенез. 1992, 23, 637-643.
2. Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. Nat. Rev. Genet. 2000, 1, 199-207.
3. Чайлахян Л.М., Вепринцев Б.Н., Свиридова Т.А., Никитин В.А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии. Биофизика, 1987, том XXXII, вып. 5. С. 874-887.
4. Осташко Ф.И., Никитин В.А., Гордиенко Н.А., Безуглый Н.Д., Кот В.В., Микрохирургическое разделение деконсервированных эмбрионов крупного рогатого скота, Республиканская научно-практическая конференция: “О широком использовании метода трансплантации эмбрионов в ускорении качественного совершенствования сельскохозяйственных животных”, Львов, 1987, 22-23 дек. С. 57-58.
5. Никитин В.А., Фесенко Е.Е. Биофизические аспекты реконструкции единичной клетки методами клеточной инженерии. Биофизика, 2006, 51 (4).
6. Никитин В.А. Техника изготовления микроинструментов для исследования клеток под микроскопом. Пущино, 1986, 122с. (под ред. проф. Б.Н. Вепринцева).
7. Кононенко В.Л., Никитин В.А., Абраскова С.В., Леткевич В.И. «Микроигла для клонирования доимплантационных эмбрионов животных», авт. св. № 1727821.
8. Nikitin V.A., Khokhlov A.M., Larin V.T., Fikhte B.A. Proc’ed’e d’intervention microchirurgicale sur les cellules et dispositif pour sa mise en oeuvre N de publication: 2 553 432.
9. Ivanova M.M., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Sobolev A.S., Landa V., Naroditsky B.S., Ernst L.K. Receptor-mediated transport of foreign DNA into preimplantation mammalian embryos. Mol. Reprod. Dev., 1999; 54, 112-120.
10. Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K., Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. J. Biol. Chem., 1998, 273, 7928-7933.
11. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Иванова М.М., Смирнова О.А., Никитин В.А., Народицкий Б.С., Эрнст Л.К. «Способ получения трансгенных животных», Патент РФ № 2108714.
12. Соболев А.С., Розенкранц А.А., Никитин В.А. «Способ направленной генетической трансформации молочной железы животного и устройство для введения генетического материала в молочный проток молочной железы животного», Патент РФ № 20252487.

**В.А. Науменкова, О.В Васильева**

*ВНИИ коневодства*

# СРАВНЕНИЕ ЗАПАДНОЙ И РОССИЙСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ЖЕРЕБЦОВ

В 2005 году в нашей лаборатории появилась возможность испытать импортное оборудование для замораживания спермы жеребцов по западной технологии. Эту возможность нам предоставил Локотской К.З., который приобрел оборудование и